

复方止血消炎软膏中五倍子鞣质的提取工艺研究

管咏梅¹ 宋昕祁¹ 张建林¹ 陈浩^{1,2} 臧振中¹ 金晨¹

(1 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌,330004; 2 江西省中医院,南昌,330006)

摘要 目的:对五倍子鞣质的提取工艺进行优化,为复方止血消炎软膏的制备工艺提供一定参考依据。方法:建立没食子酸的高效液相色谱分析方法,其色谱条件为:流动相:甲醇-乙腈-0.2%磷酸(4:11:85);柱温:30℃;检测波长:273 nm;流速:1 mL/min,进样量:10 μL。然后,以没食子酸提取率为指标,在单因素考察的基础之上,固定提取次数,以水的用量,提取时间,提取温度为因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验优化总鞣质的提取工艺。结果:建立的高效液相色谱分析方法的精密度、重复性、稳定性均符合药典要求,没食子酸在 2.34 ~ 300 μg 范围内进样量与色谱峰面积呈现良好的线性关系,其回归方程为: $Y = 29.955X + 9.6352$, $r = 1$, 其平均加样回收率为 101.88%。正交试验优选的鞣质最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3$,即在 80℃ 水浴中,用 12 倍量的水作为溶剂,提取 2 次,1.5 h/次。结论:本文所建立的高效液相色谱法色谱分析方法准确,稳定,可用于没食子酸的含量测定;正交试验优选的五倍子提取工艺稳定可靠,适用于总鞣质的提取。

关键词 五倍子;鞣质;没食子酸;浸渍法;正交试验;工艺优化;HPLC;应用

Study on Extraction Process of Tannin from Galla Chinensis in Compound Zhixue Xiaoyan Ointment

Guan Yongmei¹, Song Xinqi¹, Zhang Jianlin¹, Chen Hao^{1,2}, Zang Zhenzhong¹, Jin Chen¹

(1 Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2 Jiangxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To optimize the extraction process of Galla Chinensis tannin, and to provide a reference for the preparation of compound Zhixue Xiaoyan ointment. **Methods:** HPLC method for the analysis of gallic acid was established. The chromatographic conditions were as follows: mobile phase: methanol: acetonitrile: 0.2% phosphate 4: 11: 85; column temperature: 30℃; detection wavelength: 273 nm; flow rate: 1 mL/min, injection amount: 10 μL. Then, the extraction rate of gallic acid was taken as the index, the extraction times were fixed on the basis of single factor investigation, and the orthogonal experiment was carried out to optimize the extraction process of total tannin by orthogonal test with water dosage, extraction time and extraction temperature as factors. The $L_9(3^4)$ orthogonal table was used to carry out the orthogonal test to optimize the extraction process of total tannin. **Results:** The precision, repeatability and stability of the HPLC method were all in line with the requirements of pharmacopoeia. The linear relationship between the concentration of gallic acid in the range of 2.34 ~ 300 μg and the peak area was good. The regression equation was $Y = 29.955X + 9.6352$, the correlation coefficient $r = 1$, and the average recovery rate was 101.88%. The optimum extraction process of tannin by orthogonal test was $A_3B_1C_3$, that is, in 80℃ water bath, 12 times of water was used as solvent to extract tannin twice for 1.5 hours each time. **Conclusion:** The HPLC method established in this paper is accurate and stable, and can be used for the determination of gallic acid, and the optimum extraction process of Galla Chinensis by orthogonal test is stable and reliable, which is suitable for the extraction of total tannins.

Key Words Galla Chinensis; Tannin; Gallic acid; Soaking extraction; Orthogonal test; Process optimization; HPLC; Application

中图分类号: R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.07.005

肛瘘是临床上常见的肛肠科疾病,手术是目前肛瘘的主要治疗方法,术后开放性创面是不可避免的,其愈合过程为二期愈合,在创口愈合过程中,肉芽组织的生成、成长速度及其质量是愈合过程的关键之一,如何加速肛瘘术后创面的愈合,是肛肠科医

师亟待解决的问题,中医药治疗在肛瘘术后的治疗有独特的理论基础和临床特色,其促进创面愈合的方法很多,既有内治法,又有外治法。外治法由于操作简便,疗效确切等优势在临床上应用广泛^[1]。复方止血消炎软膏是临床经验方,在肛瘘术后治疗中

基金项目:江西省卫生厅中医处课题(20171619);江西省教育厅课题项目(160813)

作者简介:管咏梅(1979.10—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药新制剂与新技术研究, Tel: (0791) 87118614, E-mail: guanym2008@163.com

通信作者:臧振中(1979.09—),男,硕士,高级工程师,研究方向:制药工艺和制药装备研究, Tel: (0791) 87118614, E-mail: zangzhenzhongvip@163.com

有良好的治疗效果,五倍子是其中的君药。

五倍子为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill、青麸杨 *Rhus potaninii* Maxim 或红麸杨 *Rhus punjabensis* Stew. var. *sinica* (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿,主要由五倍子蚜 *Melaphis chinensis* (Bell) Baker 寄生而形成^[2]。其始载于《开宝本草》,具有敛肺降火、敛汗、止血等作用。我们国家生产的五倍子质量较好,主要集中在云南、贵州、陕西、四川等地产出,占世界总量的95%左右^[3]。鞣质为五倍子的主要有效成分,具有抗菌、抗病毒、抗氧化、清除自由基等药理作用,在临床上主要用于治疗腹泻、溃疡及降低蛋白尿等^[4]。除此之外,五倍子鞣质还能明显缩短出血时间,是一种有效的凝血物质,在临床上可用于分离血浆。没食子酸是目前发现的结构最简单的天然多酚类化合物,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化等多种作用,对肝纤维化、心血管系统疾病、神经系统疾病、糖尿病和肿瘤等具有防治作用^[5]。

由于五倍子鞣质性质不稳定,在提取过程中,易发生氧化、水解或聚合等化学反应,给含量测定带来了一定困难。在酸性条件下,水解总鞣质可得到化学性质较稳定的没食子酸,两者在量上成正比例关系,通过测定没食子酸含量,可反映出总鞣质的含量。关于五倍子总鞣质的提取研究较多,主要包括浸渍法、超声提取、微波提取、加压提取和超临界流体萃取法等。而五倍子属院内制剂复方止血消炎软膏中的君药,考虑到在实际生产中的可行性,本文选择温水浸渍法提取五倍子鞣质,在此基础上优化五倍子的提取工艺,为后期院内制剂申报提供一定参考依据。

1 材料

1.1 仪器 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,二极管阵列检测系统);KQ5200B 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);KN-500 型粉碎机(济南易辰超微粉碎技术有限公司);电子天平 BS124S(北京赛多利斯科学仪器有限公司);10TH 实验室级超纯水器型(南京易普易达科技发展有限公司);BCD-215KJN 型冷藏冷冻冰箱(青岛海尔股份有限公司);1 000 μ L 移液器(Thermo 公司);万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);涡旋仪(IKA 仪器设备有限公司)。

1.2 试剂 没食子酸对照品(中药固体制剂制造技术国家工程中心,生产批号: BCTG-0169,纯度 > 98%);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);甲醇(分析纯,西陇化工股份

有限公司,生产批号:170106);乙醇(分析纯,西陇科学股份有限公司;批号:180102)。

1.3 分析样品 五倍子(江西江中中药饮片有限公司,生产批号:170214)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相: 甲醇-乙腈-0.2% 磷酸(4: 11: 85);温度: 30 $^{\circ}$ C;检测波长: 273 nm;流速: 1 mL/min,进样量: 10 μ L。理论板数按没食子酸峰计算不低于 6 000。

2.2 对照品储备溶液的制备 取没食子酸对照品适量,精密称定约 6 g,置于 10 mL 容量瓶中,加 50% (V/V) 甲醇溶液稀释至刻度线,置于微型振荡器震荡 2 min,充分混匀,制成 600 μ g/mL 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取五倍子药材适量,粉碎,过三号筛,再取 1 g,精密称定,加入 10 倍量体积的蒸馏水,50 $^{\circ}$ C 水浴中加热浸渍 2 h,提取 2 次,过滤,合并滤液,并置于旋转蒸发仪上蒸干。再加入 4 mol/L 盐酸溶液 20 mL,60 $^{\circ}$ C 水浴中加热水解 3.5 h,放冷,定容至 25 mL,取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加 50% (V/V) 甲醇溶液定容。用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液适量,即为供试品溶液。

2.4 专属性试验 取空白溶剂、没食子酸对照品和五倍子供试品按“2.1”项下建立的色谱条件进样。

2.5 线性关系考察 精密量取没食子酸对照品储备溶液适量,分别用 50% (V/V) 甲醇配制含没食子酸 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 2.34 μ g/mL 的对照品溶液。按上述色谱条件对各浓度的对照品溶液进行检测,以对照品溶液浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。

2.6 精密度试验 取同一没食子酸对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,进样 10 μ L/次,连续测定 3 d,记录色谱峰的峰面积及相对保留时间,计算 RSD 值。

2.7 供试品溶液稳定性试验 按“2.3”项的方法制备五倍子供试品溶液一份,按“2.1”项下的色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进行测定,记录色谱峰面积值,计算 RSD 值。

2.8 重复性试验 按“2.3”项下方法制备 6 份五倍子供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱峰的峰面积及相对保留时间,计算 RSD 值。

2.9 回收率试验 首先,制备五倍子供试品溶液一份,按照上述色谱条件测定 3 次,取平均值为实际含

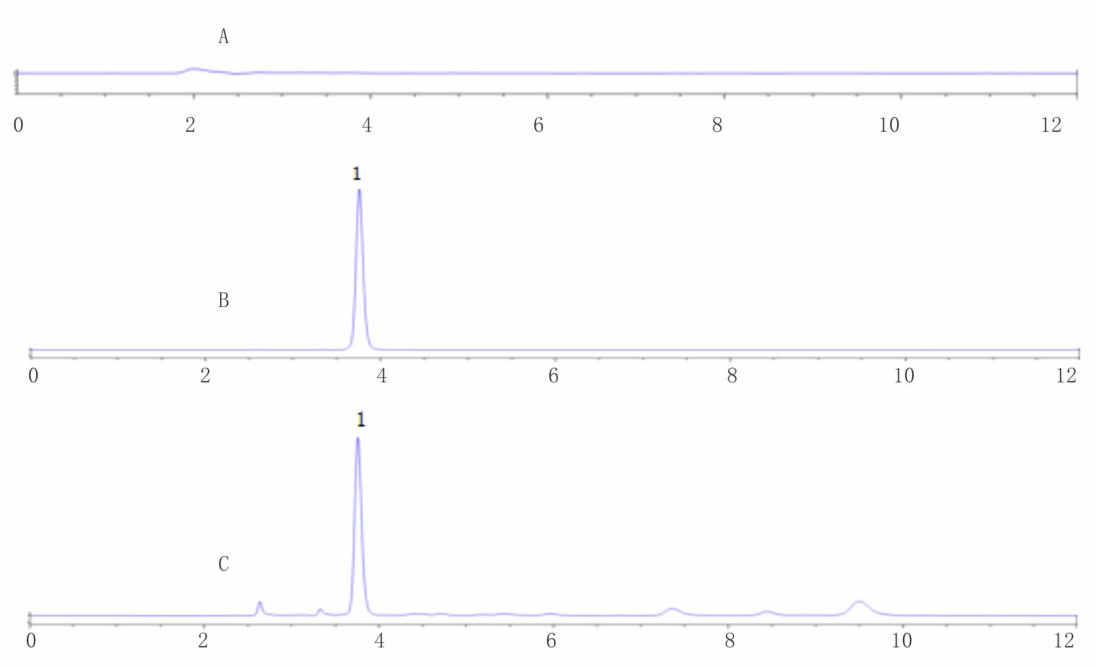


图1 空白溶剂(A)、没食子酸对照品(B)、五倍子样品(C)的 HPLC 图

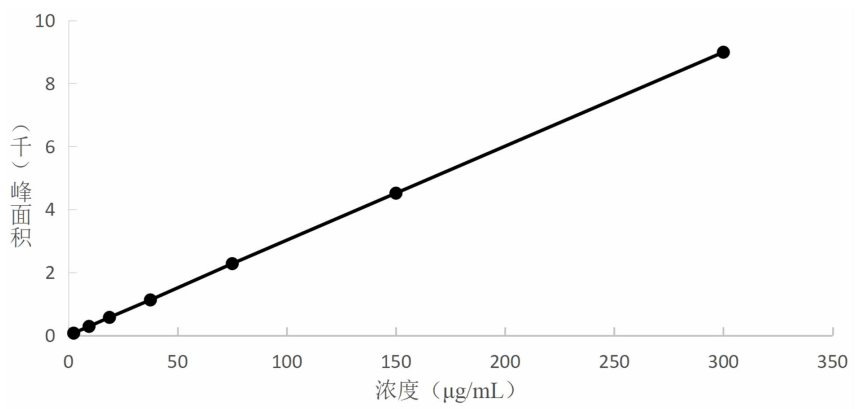


图2 没食子酸的线性关系图

量。精密量取已知含量的试品溶液 2 mL,共 9 份,每 3 份为一组,按实际含量的 0.5,1,1.5 倍加入没食子酸对照品溶液,分别作为高、中、低水平,以“2.1”项色谱条件分别对各样品其进行检测,计算没食子酸的加样回收率。

3 结果

3.1 专属性试验结果 结果表明空白溶剂对测定无干扰。见图 1。

3.2 线性关系结果 求得回归方程:Y = 29.955X + 9.635 2,r=1。结果表明:在 2.34 ~ 300 μg 范围内,没食子酸的浓度与峰面积具有良好的线性关系。见图 2。

3.3 精密度试验结果 3 d 内峰面积的 RSD 值分别为 0.07%,0.13% 及 0.18%,表明该仪器的日内及日间精密度良好。见表 1。

3.4 供试品溶液稳定性试验结果 24 h 内供试品色谱峰峰面积值的 RSD 值为 0.35%,表明没食子酸

在 24 h 内稳定性良好。见表 2。

表1 精密度考察结果

样品 编号	时间					
	1 d		2 d		3 d	
	峰面积 (mV · min)	RSD (%)	峰面积 (mV · min)	RSD (%)	峰面积 (mV · min)	RSD (%)
1	1 895.3		1 893.9		1 891.3	
2	1 896.6		1 891.2		1 891.0	
3	1 896.1	0.07	1 895.1	0.13	1 888.0	0.18
4	1 896.8		1 898.5		1 892.6	
5	1 899.3		1 896.5		1 895.2	
6	1 897.85		1 894.8		1 898.0	

3.5 重复性试验结果 6 份样品峰面积的 RSD 值为 1.53%,表明该方法重复性良好。见表 3。

3.6 回收率试验结果 高、中、低水平的回收率值均小于 103%,其平均回收率为 101.88%,RSD 值为 0.56%,符合药典要求。表明该方法准确度良好。见表 4。

表 2 稳定性考察结果

时间(h)	0	2	4	6	8	10	12	24
峰面积(mV·min)	1 868. 6	1 873. 7	1 866. 3	1 872. 2	1 881. 2	1 875. 0	1 862. 3	1 862. 4

表 3 重复性考察结果

样品编号	样品量(g)	峰面积(mV·min)	RSD 值(%)
1	0. 500 7	1 902. 0	1. 53
2	0. 500 4	1 850. 2	
3	0. 500 9	1 868. 6	
4	0. 500 6	1 891. 4	
5	0. 500 4	1 901. 3	
6	0. 500 7	1 933. 2	

表 4 加样回收率考察结果

样品 编号	实际含量 (μg)	加标量 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD 值 (%)
1	37. 11	18. 56	56. 13	102. 47	101. 88	0. 56
2	37. 65	18. 68	56. 71	102. 03		
3	37. 19	18. 57	56. 11	101. 89		
4	39. 22	39. 31	78. 87	100. 86		
5	39. 10	38. 89	78. 87	102. 26		
6	37. 65	37. 45	75. 83	101. 95		
7	39. 52	59. 34	99. 52	101. 11		
8	39. 15	58. 64	99. 22	101. 81		
9	37. 34	55. 84	94. 59	102. 53		

3. 7 正交试验优选五倍子鞣质的提取工艺

3. 7. 1 正交试验的因素及水平选择 在查阅相关文献^[6-7]后,采用水作为提取溶剂,对提取次数,料液比,提取时间,提取温度 4 个因素进行单因素考察。以没食子酸含量为指标,先固定 3 个因素的水平,对另外一个因素设定 5 个水平进行实验,考察该因素对没食子酸提取量的影响。首先考察了提取次数,发现当提取次数为 2 次时,五倍子中没食子酸已基本提取完全,所以固定提取次数为 2 次。然后,选择溶剂用量分别为 4,6,8,10,12 倍量进行实验,结果表明:料液比小于 1: 10 时,没食子酸的提取率随着溶剂用量的增加而增大,此后,随着料液比的增加,提取率有所降低。最终正交试验的溶剂用量的水平分别为 8,10,12 倍量。此后,选择提取温度分别为 40,60,80,100 ℃ 进行回流提取实验,结果表明:温度为 60 ℃ 时,没食子酸的提取率最高,此后随着温度升高,没食子酸含量逐渐下降,最终选择提取温度为 40,60,80 ℃ 3 个水平进行正交试验设计。最后,分别选取提取时间为 1,1. 5,2,2. 5,3 h 进行回流提取实验,当提取时间由 1 h 增加到 2 h 时,提取率上升,此后延长提取时间,提取率有所下降。最终选择 1. 5,2,2. 5 h 作为 3 水平进行正交试验。

3. 7. 2 正交试验设计 在单因素考察的基础上,以没食子酸的提取率为指标,固定提取次数为 2 次,以溶剂用量、提取时间、提取温度为 3 因素进行正交试验设计,优化五倍子的提取工艺。见表 5、6。

表 5 因素水平表

水平	因素		
	A(料液比)	B(提取时间,h)	C(提取温度,℃)
1	8	1. 5	40
2	10	2. 0	60
3	12	2. 5	80

表 6 正交设计试验安排及结果

试验号	因素			试验结果
	A (料液比)	B (提取时间,h)	C (提取温度,℃)	没食子酸含量 (mg/g)
1	1	1	1	53. 04
2	1	2	2	71. 85
3	1	3	3	66. 78
4	2	1	2	38. 61
5	2	2	3	85. 86
6	2	3	1	71. 08
7	3	1	3	117. 33
8	3	2	1	110. 31
9	3	3	2	99. 95
K1	63. 890	69. 660	78. 143	
K2	65. 183	89. 340	70. 137	
K3	109. 197	79. 270	89. 990	
R	45. 307	19. 680	19. 853	

由上表看出,因素 A(料液比)的极差值最大,为 45. 307,因素 B(提取时间)与因素 C(提取温度)的极差值基本相同,分别为 19. 680 和 19. 853。表明,料液比对没食子酸提取率的影响最大,是主要因素,提取温度的影响次之,提取时间对该工艺的影响最小。从正交试验结果分析得到,在 9 组试验中,没食子酸的最高含量为 117. 33 mg/g,其工艺为 A₃B₁C₃,即在 80 ℃ 水浴中,用 12 倍量的水作为溶剂,提取 2 次,1. 5 h/次。为验证该提取工艺的可靠性,采用相同提取工艺条件,平行制备 3 份样品,结果表明,该工艺条件稳定,可靠,可用于五倍子鞣质的提取。

4 讨论

在没食子酸 HPLC 分析方法的建立过程中,首先对检测波长进行考察,发现在 273 nm 处,没食子酸响应值较大,其他杂质成分基本无干扰,因此选择

该波长为最终检测波长。在流动相的选择过程中,采用甲醇与磷酸混合使用,其色谱峰峰形拖尾严重,增加磷酸的体积浓度也无改善,采用乙腈与磷酸混合使用,其峰形前沿严重,不加磷酸,则洗脱不出没食子酸。所以选择甲醇-乙腈-磷酸 3 种试剂为最终流动相,其峰形良好,对称因子符合要求,样品中没食子酸色谱峰与其他色谱峰之间的分离度均大于 1.5。在正交试验设计阶段,发现当提取次数为 2 次时,五倍子中没食子酸已基本提取完全,所以固定提取次数为 2 次,未将提取次数作为因素进行正交试验,减少工作量。

五倍子总鞣质属于可水解鞣质,是复杂多元酚类的混合物,相对分子质量较大、极性较强、易溶于水。但其含量测定较困难,常以没食子酸的量表征五倍子总鞣质的含量。没食子酸又称五倍子酸,化学名称为 3,4,5-三羟基苯甲酸,是五倍子鞣质的水解产物。通过五倍子制备没食子酸的途径有 2 种,包括化学法和生物法,化学法分为酸水解法和碱水解法,生物法包括酶法和发酵法,在完全水解的情况下,五倍子鞣质可生成 7~9 分子的没食子酸^[8]。

目前,工业上直接以水为溶剂从五倍子中浸提鞣质,所得产品最高纯度为 78%~80%,仅仅适用于工业上的使用要求,而对医药行业所需要的高纯度、高质量的鞣质,则远远不能满足。一方面,由于五倍子鞣质是复杂多元酚类的混合物,分子量较大、极性较强,而且植物鞣质与黄酮类、蒽醌类和木质素等在植物体内共存并且性质相近,因此分离提纯为单体是非常困难的;另一方面,鞣质性质较为活泼,在提纯

过程中,容易发生氧化、离解、或聚合等化学反应,从而也给鞣质的定量测定带来很大困难。有研究表明^[9],pH=2 的环境下,以 100% 丙酮作为提取溶剂、温度 50℃、时间 10 min 为五倍子鞣质的最佳提取工艺并采用乙酸乙酯萃取的鞣质最终得率较高,且鞣质纯度达到了 89.15%。但主要存在有机溶剂残留的问题,在医药行业的应用还受到限制。在今后的研究中需要进一步探索五倍子鞣质的提取方法,以期得到一种简易可行、纯度较高、质量较好且适宜于制药行业应用的鞣质提取方法。

参考文献

- [1] 郑春菊,王业皇. 肛瘻术后创面愈合的中医学研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(2):207-209.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1 部. 北京:中国医药科技出版社,2015:67.
- [3] 张雅丽,李建科,刘柳,等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(10):386-390.
- [4] 周劲光. 五倍子的药理作用与临床研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(4):30-32.
- [5] 郑雪花,杨君,杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(1):94-98,102.
- [6] 陈丹妮,秦昆明,陈林伟,等. 响应面法优化五倍子总鞣质的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):20-24.
- [7] 杜瑞莲,杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药,2008,30(6):839-841.
- [8] 张雅丽,李建科,刘柳,等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(10):386-390.
- [9] 帅益武,尤玉如,袁海娜. 五倍子中鞣质的提取、分离纯化研究[J]. 食品科技,2007,32(6):125-128.

(2019-06-05 收稿 责任编辑:徐颖)